

ภาคผนวก 1

เอกสารรับรองความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัย

4/47 30m47 610.3

ที่ ศธ 0521.1.03/ 0710



คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ตู้ไปรษณีย์เลขที่ 17
ที่ทำการไปรษณีย์โทรเลขคองหงส์
อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

หนังสือฉบับนี้ให้ไว้เพื่อรับรองว่า

โครงการวิจัยเรื่อง "การปล่อยโปรตีนจากสารโคโคซานที่ผสมอยู่ในวัสดุกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์"

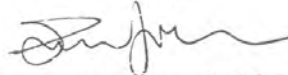
หัวหน้าโครงการ นางสาวอารยา ลิมาภรณ์วัฒน์

สังกัดหน่วยงาน นักศึกษาระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก
ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ได้ผ่านการพิจารณาและได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัย (Ethics Committee)

ซึ่งเป็นคณะกรรมการพิจารณาศึกษาวินิจฉัยในคนของคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ แล้ว

ให้ไว้ ณ วันที่ 4 สิงหาคม 2547



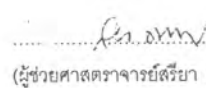
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุวรรณา จิตภักดีสินทร์)

รองคณบดีฝ่ายวิจัยและวิเทศสัมพันธ์

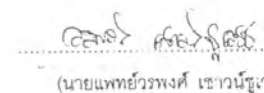
ประธานกรรมการ



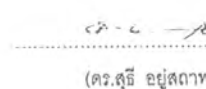
กรรมการ
(รองศาสตราจารย์วิลาศ สัตยสินธุ์สกุล)



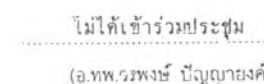
กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สิริยา ศรีสินทร์)



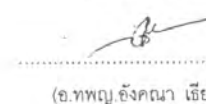
กรรมการ
(นายแพทย์วรพงษ์ เขาวนัฐเวช)



กรรมการ
(ดร.สุธี อยู่สุดาพร)



ไม่ได้เข้าร่วมประชุม
(อ.ทพ.วรพงษ์ ปิยะญาสงค์)



กรรมการ
(อ.ทพญ.อังคณา เขียรมนตรี)

ภาคผนวก 2

| ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์ สารเคมี | บริษัทผู้ผลิต |
|--|---------------|
| alpha modification of Eagle's medium (MEM) | Gibco |
| 20% fetal calf serum (FCS) | Seromed |
| 100um L-ascorbic acid 2-phosphate | Sigma |
| 2Mm L-glutamate | Gibco |
| 100 units/ml penicillin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร streptomycin | Gibco |
| fungizone | Gibco |

ตารางที่ 12 แสดงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์ สารเคมีและบริษัทผู้ผลิต

| สารเคมี SDS polyacrylamide gel electrophoresis of protein | บริษัทผู้ผลิต |
|---|---------------|
| Acrylamide | Bio-Rad |
| TEMED | Bio-Rad |
| Ammonium persulfate | Sigma |
| SDS-PAGE Molecular weight standard | Invitrogen |

| สารเคมี MTT assay | บริษัทผู้ผลิต |
|---|---------------|
| (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) | Sigma |
| dimethyl sulfoxide (DMSO) | Sigma |
| (N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES) | Sigma |
| Glycine | Sigma |

ภาคผนวก 3

วิธีการเตรียม polyacrylamide gel ในการทดลอง SDS-PAGE

เตรียม polyacrylamide gel ที่อยู่บนกระจกแบนขนาด 10×12 เซนติเมตร และความหนาของเจลประมาณ 1 มิลลิเมตร จากการเตรียม

Separating gel = 12.5 % (v/v) total acrylamide gel

Stacking gel = 4.5% (v/v) total acrylamide gel

1. เตรียม 12.5% separating gel ประกอบด้วย

| | |
|--------------------------------------|----------------|
| 30% Stock acrylamide gel | 6.25 มิลลิลิตร |
| Stock separating gel buffer (pH 8.8) | 3.75 มิลลิลิตร |
| น้ำ | 5.00 มิลลิลิตร |
| TEMED | 15.0 ไมโครลิตร |
| 10% Ammonium persulfate | 150 ไมโครลิตร |

ผสมสารเข้าด้วยกันเทในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกประกบกับแผ่นอลูมิเนียม

และผนึกตามขอบด้วยวุ้นธรรมชาติ

2. เตรียม 4.5% Stacking gel

| | |
|------------------------------------|----------------|
| 30% Stock acrylamide gel | 750 มิลลิลิตร |
| Stock stacking gel buffer (pH 8.8) | 1.25 มิลลิลิตร |
| น้ำ | 3.00 มิลลิลิตร |
| TEMED | 5.00 ไมโครลิตร |
| 10% Ammonium persulfate | 50.0 ไมโครลิตร |

ภาคผนวก 4

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ 13 แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติเมื่อทดสอบค่าเฉลี่ยโปรตีนที่ปลดปล่อยออกมาต่อหนึ่งหน่วยขึ้นทดสอบต่อหนึ่งชั่วโมง (ไมโครกรัม/กรัม/ชั่วโมง) ในช่วงเวลาต่างๆ ด้วยสถิติ Multiple Comparisons วิธี Tukey HSD

| (I) GIC+Tx | J) GIC+Tx | M e a n Difference (I-J) | Std Error | P- value | 95 % Confidence Interval | |
|------------|-----------|-----------------------------|--------------|----------|--------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| GIC+AL | GIC +CS | .7033 | .9817 | .758 | -1.8466 | 3.2532 |
| | GIC+CS+AL | -5.0196* | .9817 | .000 | -7.5695 | -2.4697 |
| GIC+CS | GIC+AL | -.7033 | .9817 | .758 | -3.2532 | 1.8466 |
| | GIC+CS+AL | -5.7229* | .9817 | .000 | -8.2728 | -3.1730 |
| GIC+CS+AL | GIC+AL | 5.0196 | .9817 | .000 | 2.4697 | 7.5695 |
| | GIC+CS | 5.7229* | .9817 | .000 | 3.1730 | 8.2728 |

*ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ตารางที่ 14 แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติเมื่อทดสอบค่าเฉลี่ยน้ำหนักของขึ้นทดสอบในแต่ละกลุ่ม (มิลลิกรัม) ด้วยสถิติ Multiple Comparisons วิธี Tukey HSD

| (I) GIC+Tx | J) GIC+Tx | Mean Difference (I-J) | Std Error | P- value | 95 % Confidence Interval | |
|------------|-----------|--------------------------|--------------|----------|--------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| GIC+AL | GIC +CS | -16.5783* | 5.1234 | .014 | -29.8863 | -3.2703 |
| | GIC+CS+AL | -20.0469* | 5.1234 | .004 | -33.3549 | -6.7388 |
| GIC+CS | GIC+AL | -16.5783* | 5.1234 | .014 | 3.2703 | 29.8863 |
| | GIC+CS+AL | -3.4685 | 5.1234 | .780 | -16.7765 | 9.8395 |
| GIC+CS+AL | GIC+AL | -20.0469* | 5.1234 | .004 | 6.7388 | 33.3549 |
| | GIC+CS | 3.4685 | 5.1234 | .780 | -9.8395 | 16.7765 |

*ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ตารางที่ 15 แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติเมื่อทดสอบร้อยละของค่าเฉลี่ย absorbance ของกลุ่มทดลอง
เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งแปรผลตาม จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตจากการทดสอบ

| (I) Group | (J) Group | Mean Difference (I-J) | Std. Error | P- value. | 95% Confidence Interval | | |
|------------|------------|-----------------------------|------------|-----------|-------------------------|-------------|----------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | |
| Tukey HSD | GIC1D | GIC 2 D | -2.5227 | 5.5299 | .997 | -18.5851 | 13.5398 |
| | | GIC 7 D | 35.3279* | 5.5299 | .000 | 19.2655 | 51.3904 |
| | | GIC+CS 1 D | -7.6468 | 5.5299 | .737 | -23.7093 | 8.4156 |
| | | GIC+CS 2 D | 3.2934 | 5.5299 | .991 | -12.7691 | 19.3559 |
| | | GIC+CS 7 D | 17.2919* | 5.5299 | .027 | 1.2294 | 33.3544 |
| | GIC 2 D | GIC 1 D | 2.5227 | 5.5299 | .997 | -13.5398 | 18.5851 |
| | | GIC 7 D | 37.8506* | 5.5299 | .000 | 21.7881 | 53.9131 |
| | | GIC+CS 1 D | -5.1242 | 5.5299 | .939 | -21.1866 | 10.9383 |
| | | GIC+CS 2 D | 5.8161 | 5.5299 | .899 | -10.2464 | 21.8785 |
| | | GIC+CS 7 D | 19.8146* | 5.5299 | .007 | 3.7521 | 35.8770 |
| | GIC 7 D | GIC 1 D | -35.3279* | 5.5299 | .000 | -51.3904 | -19.2655 |
| | | GIC 2 D | -37.8506* | 5.5299 | .000 | -53.9131 | -21.7881 |
| | | GIC+CS 1 D | -42.9748* | 5.5299 | .000 | -59.0373 | -26.9123 |
| | | GIC+CS 2 D | -32.0346* | 5.5299 | .000 | -48.0970 | -15.9721 |
| | | GIC+CS 7 D | -18.0361* | 5.5299 | .018 | -34.0985 | -1.9736 |
| | GIC+CS 1 D | GIC 1 D | 7.6468 | 5.5299 | .737 | -8.4156 | 23.7093 |
| | | GIC 2 D | 5.1242 | 5.5299 | .939 | -10.9383 | 21.1866 |
| | | GIC 7 D | 42.9748* | 5.5299 | .000 | 26.9123 | 59.0373 |
| | | GIC+CS 2 D | 10.9402 | 5.5299 | .362 | -5.1223 | 27.0027 |
| | | GIC+CS 7 D | 24.9387* | 5.5299 | .000 | 8.8762 | 41.0012 |
| GIC+CS 2 D | GIC 1 D | -3.2934 | 5.5299 | .991 | -19.3559 | 12.7691 | |
| | GIC 2 D | -5.8161 | 5.5299 | .899 | -21.8785 | 10.2464 | |
| | GIC 7 D | 32.0346* | 5.5299 | .000 | 15.9721 | 48.0970 | |
| | GIC+CS 1 D | -10.9402 | 5.5299 | .362 | -27.0027 | 5.1223 | |
| | GIC+CS 7 D | 13.9985 | 5.5299 | .125 | -2.0640 | 30.0610 | |
| GIC+CS 7 D | GIC 1 D | -17.2919* | 5.5299 | .027 | -33.3544 | -1.2294 | |
| | GIC 2 D | -19.8146* | 5.5299 | .007 | -35.8770 | -3.7521 | |
| | GIC 7 D | 18.0361* | 5.5299 | .018 | 1.9736 | 34.0985 | |
| | GIC+CS 1 D | -24.9387* | 5.5299 | .000 | -41.0012 | -8.8762 | |
| | GIC+CS 2 D | -13.9985 | 5.5299 | .125 | -30.0610 | 2.0640 | |

MTT assay ด้วยสถิติ Multiple Comparisons วิธี Tukey HSD

*ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ

ภาคผนวก 4

ตารางที่ 16 แสดงค่าโปรตีนที่ปลดปล่อยออกมาต่อหนึ่งหน่วยชี้นทดสอบ (ไมโครกรัม/กรัม ซีเมนต์)

| เวลา (ชั่วโมง) | GIC ชั้นที่ 1 | GIC ชั้นที่ 2 | GIC ชั้นที่ 3 | GIC+AL ชั้นที่ 1 | GIC+AL ชั้นที่ 2 | GIC+AL ชั้นที่ 3 | GIC+AL ชั้นที่ 4 | GIC+AL ชั้นที่ 5 | GIC+AL ชั้นที่ 6 |
|----------------|---------------|---------------|---------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 1 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 19.14 | 7.88 | 46.19 | 7.21 | 2.69 | 0.00 |
| 6 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 2.54 | 2.39 | 0.00 | 0.00 |
| 12 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 24 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 1.69 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 48 | | | | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 64 | | | | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 168 | | | | 4.72 | 18.47 | 13.78 | 14.12 | 7.03 | 2.40 |
| 336 | | | | 13.41 | 14.10 | 15.51 | 21.05 | 10.67 | 11.46 |

ในแต่ละชี้นทดสอบที่ช่วงเวลาต่าง ๆ

| เวลา (ชั่วโมง) | GIC+CS ชั้นที่ 1 | GIC+CS ชั้นที่ 2 | GIC+CS ชั้นที่ 3 | GIC+CS ชั้นที่ 4 | GIC+CS ชั้นที่ 5 | GIC+CS ชั้นที่ 6 |
|----------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 1 | 4.72 | 13.46 | 5.02 | 14.14 | 0.00 | 7.12 |
| 6 | 4.50 | 4.52 | 3.03 | 5.32 | 0.00 | 0.00 |
| 12 | 2.54 | 4.74 | 1.48 | 1.87 | 0.00 | 0.00 |
| 24 | 7.11 | 4.95 | 5.90 | 1.66 | 0.82 | 1.46 |
| 48 | 1.24 | 1.25 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 64 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 168 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 336 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 |

ตารางที่ 16 (ต่อ) แสดงค่าโปรตีนที่ปลดปล่อยออกมาต่อหนึ่งหน่วยชั้นทดสอบ (ไมโครกรัม/กรัม ซีเมนต์) ในแต่ละชั้นทดสอบที่ช่วงเวลาต่าง ๆ

| เวลา (ชั่วโมง) | GIC+CS+AL ชั้นที่ 1 | GIC+CS+AL ชั้นที่ 2 | GIC+CS+AL ชั้นที่ 3 | GIC+CS+AL ชั้นที่ 4 | GIC+CS+AL ชั้นที่ 5 | GIC+CS+AL ชั้นที่ 6 |
|----------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 1 | 44.50 | 40.10 | 41.77 | 22.05 | 58.84 | 60.21 |
| 6 | 21.75 | 18.43 | 18.12 | 14.61 | 17.90 | 20.90 |
| 12 | 17.80 | 13.70 | 14.09 | 11.39 | 16.18 | 17.42 |
| 24 | 21.26 | 21.92 | 17.61 | 19.07 | 18.88 | 18.16 |
| 48 | 18.54 | 18.93 | 18.62 | 18.08 | 18.88 | 20.15 |
| 64 | 27.93 | 16.94 | 16.61 | 17.34 | 17.65 | 19.41 |
| 168 | 21.51 | 21.17 | 20.38 | 27.50 | 21.33 | 21.40 |
| 336 | 20.76 | 25.16 | 17.61 | 19.32 | 21.58 | 20.90 |

